

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

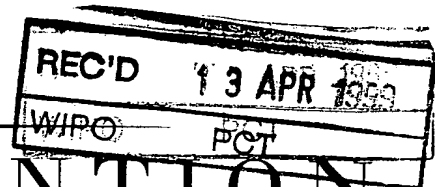
IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



ETKU



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 MARS 1999

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **24.MAR.1998**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **98 03573 -**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **77**
DATE DE DÉPÔT **24 MARS 1998**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

RHONE-POULENC RORER S.A.
Direction Brevets
20 avenue Raymond Aron
92165 ANTONY CEDEX

n° du pouvoir permanent 07/08/1997 références du correspondant ST98008 téléphone 01 55 71 70 36

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale
☒ brevet d'invention

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

VECTEURS DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES, COMPOSITIONS LES CONTENANT, ET LEURS UTILISATIONS.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 3.0.4.4.6.3.2.8.4 code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

RHONE-POULENC RORER

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

Pays

**20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY**

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DERNONCOUR Roxane

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08

Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9803173

ST98008

TITRE DE L'INVENTION :

**VECTEURS DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES, COMPOSITIONS LES
CONTENANT, ET LEURS UTILISATIONS.**

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

RHONE-POULENC RORER S.A.
20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- CIOLINA Carole

13 C, avenue du Docteur Arnold Netter
75012 PARIS (FRANCE)

- SCHERMAN Daniel

10 rue Erard
75012 PARIS (FRANCE)

- WILS Pierre

4 rue Bailly
75003 PARIS (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Antony, le 24 mars 1998

RHONE-POULENC RORER S.A.
Fondé de Pouvoir

DERNONCOUR Roxane

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
42, 43, 45, 46			X	2.06.98	18 JUIN 1998 - S.R.

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

BT 244 / 171180

VECTEURS DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES. COMPOSITIONS LES
CONTENANT. ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs et leur utilisation pour le transfert d'acides nucléiques. Plus particulièrement, l'invention concerne de nouveaux vecteurs capables de diriger des acides nucléiques vers des cellules ou des compartiments cellulaires spécifiques.

Le transfert d'acides nucléiques est une technique à la base de toutes les applications majeures de la biotechnologie et l'augmentation de l'efficacité du transfert des acides nucléiques constitue un enjeu très important pour le développement des ces applications. L'efficacité du transfert des acides nucléiques dépend de nombreux facteurs parmi lesquels la capacité des acides nucléiques à atteindre la cellule cible, leur faculté à franchir la membrane plasmique et leur aptitude à être transportés au sein de la cellule jusqu'au noyau.

Un des obstacles majeurs à l'efficacité du transfert des acides nucléiques provient du fait que l'information génétique est souvent peu ou pas dirigée vers l'organe cible à laquelle elle est destinée. Par ailleurs, une fois que l'acide nucléique a pénétré dans la cellule cible, il doit encore être dirigé vers le noyau afin d'y être exprimé. De plus, dans le cas de transfert d'acides nucléiques dans des cellules différenciées ou quiescentes, le noyau est limité par une enveloppe nucléaire qui constitue une barrière supplémentaire au passage de ces acides nucléiques.

Les virus recombinants utilisés comme vecteurs possèdent des mécanismes évolués et efficaces pour guider les acides nucléiques jusqu'au noyau. Cependant, les vecteurs viraux présentent certains inconvénients inhérents à leur nature virale, qu'il n'est malheureusement pas possible d'exclure totalement. Une autre stratégie consiste donc soit à transfecter l'ADN nu, soit à utiliser des agents non viraux capables de promouvoir le transfert d'ADN dans des cellules eucaryotes. Mais les vecteurs non viraux ne possèdent pas de signaux de ciblage sub-cellulaires ou nucléaires. Le passage de l'ADN nu, ou en combinaison avec un agent non-viral, du cytoplasme vers

le noyau est ainsi une étape qui présente une efficacité très faible (Zabner et al., 1995).

Différentes tentatives d'attachement de signaux de ciblage ont ainsi été faites. Notamment, des fragments peptidiques pour le ciblage ont été attachés covalamment
5 à des d'oligonucléotides [Eritja et al., *Synthesis of defined peptide-oligonucleotide hybrids containing a nuclear transport signal sequence*, Tetrahedron, Vol. 47, N° 24, pp. 4113-4120, 1991]. Les complexes ainsi formés sont de bons candidats comme inhibiteurs potentiels de l'expression génétique.

Des vecteurs de transfection comprenant un polypeptide synthétique couplé
10 par des interactions électrostatiques à une séquence d'ADN ont également été décrits dans la demande de brevet WO 95/31557, ledit polypeptide étant constitué d'une chaîne polymère d'acides aminés basiques, d'un peptide NLS, et d'une région charnière qui connecte le peptide NLS à la chaîne polymérique et permet d'éviter les interactions stériques. Mais ce genre de constructions pose un problème de stabilité
15 car les interactions mises en jeu entre l'ADN et le signal de ciblage sont de nature électrostatique.

Il existe par ailleurs des chimères acide nucléique-peptide de ciblage spécifique décrites dans la demande de brevet WO 95/34664, la liaison entre les deux étant de nature chimique. Mais cette méthode passe notamment par des étapes
20 enzymatiques difficilement contrôlables et ne permettant pas de produire de grandes quantités d'acides nucléiques.

Enfin, il a été montré qu'il est possible d'attacher une séquence NLS (Nuclear Localisation Signal) à un ADN plasmidique (Nature Biotechnology, Volume 16, pp. 80-85, January 1998). Mais une inhibition totale de la transcription du gène d'intérêt
25 du fait de l'attachement au hasard de plusieurs centaines de séquences NLS sur le plasmide a été observée. Une solution proposée consiste à lier les séquences NLS sur des fragments linéaires d'ADN, puis à coupler ces fragments modifiés avec d'autres fragments non-modifiés. Cependant, cette technique présente comme précédemment l'inconvénient de passer par au moins une étape enzymatique.

Ainsi, toutes les méthodes proposées jusqu'à présent ne permettent pas de résoudre de manière satisfaisante les difficultés liées au ciblage des ADN double brin.

La présente invention propose une solution avantageuse à ces problèmes. Plus particulièrement, la présente invention met en oeuvre des oligonucléotides conjugués
5 à des signaux de ciblage et capables de former des triples hélices avec une/des séquence(s) spécifique(s) présente(s) sur une molécule d'ADN double brin.

Un tel vecteur présente l'avantage de pouvoir diriger un ADN double brin vers des cellules ou des compartiments cellulaires spécifiques, sans que l'expression génétique ne soit inhibée. La demanderesse a en effet montré que la présence de
10 signaux de ciblage n'affecte pas l'expression des gènes d'intérêt lorsque la séquence spécifique au niveau de laquelle se forme la triple hélice est située en dehors de la cassette d'expression du gène à transférer.

Le vecteur obtenu présente de plus l'avantage d'incorporer des signaux de ciblage qui sont liés de façon stable à l'ADN double brin, en particulier lorsque
15 l'oligonucléotide susceptible de former la triple hélice est modifié par la présence d'un agent alkylant.

Un autre avantage de l'invention est de permettre de coupler l'ADN à transférer à des signaux de ciblage dont on contrôle à la fois le nombre et la nature. Différents signaux de ciblage peuvent être couplés sur le même ADN, et dans ce cas il
20 est aussi possible d'en déterminer préalablement les proportions respectives.

Enfin, la triple hélice fonctionnalisée obtenue ne résulte que d'étapes de transformations chimiques et peut donc être obtenue de façon simple, reproductible, et en très grandes quantités, notamment industrielles.

Un premier objet de l'invention concerne donc un vecteur utile en transfection
25 capable de cibler une cellule et/ou un compartiment cellulaire spécifique. Plus particulièrement, le vecteur selon l'invention comprend une molécule d'ADN double brin et au moins un oligonucléotide couplé à un signal de ciblage et capable de former

par hybridation une triple hélice avec une séquence spécifique présente sur ladite molécule d'ADN double brin.

On entend au sens de l'invention par "ADN double brin" un acide désoxyribonucléique double brin qui peut être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc...Il peut être obtenu par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banque, par synthèse chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Il peut être modifié chimiquement.

Cet ADN double brin peut être sous forme linéaire ou circulaire. Dans ce dernier cas, l'ADN double brin peut être dans un état superenroulé ou relâché. Préférentiellement, la molécule d'ADN est de forme circulaire et dans une conformation superenroulée.

L'ADN double brin peut également porter une origine de réplication fonctionnelle ou non dans la cellule cible, un ou plusieurs gènes marqueurs, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réplication, des gènes d'intérêt thérapeutique, des séquences antisens modifiées ou non, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc... De préférence, l'ADN double brin comprend une cassette d'expression constituée d'un ou plusieurs gènes d'intérêt sous contrôle d'un ou plusieurs promoteurs et d'un terminateur transcriptionnel actifs dans les cellules cibles.

Il s'agit généralement d'un plasmide ou d'un épisome portant un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique. A titre d'exemple on peut citer les plasmides décrits dans les demandes de brevet WO 96/26270 et WO 97/10343 incorporées à la présente par référence.

Au sens de l'invention, on entend par gène d'intérêt thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit thérapeutique ainsi codé peut être notamment une protéine ou un peptide. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune

pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène d'intérêt thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc... Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines [interleukines, interférons, TNF, etc (FR 92/03120)], les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques [BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc, la dystrophine ou une minidystrophine (FR 91/11947)], la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs [p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93/04745)], les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation [Facteurs VII, VIII, IX], les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides [thymidine kinase, cytosine déaminase], les gènes de l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les gènes correspondant aux protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, de type apolipoprotéine choisie parmi les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J et apo(a), les enzymes du métabolisme comme par exemple la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique, la lécithine cholestérol acyltransférase, la 7 alpha cholestérol hydroxylase, la phosphatidique acide phosphatase, ou encore des protéines de transfert de lipides comme la protéine de transfert des esters de cholestérol et la protéine de transfert des phospholipides, une protéine de liaisons des HDL ou encore un récepteur choisi par exemple parmi les récepteurs LDL, récepteurs des chylomicrons-remnants et les récepteurs scavenger, etc...

L'ADN d'intérêt thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes d'intérêt thérapeutique comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201), ou les séquences codant des anticorps intracellulaires à simple chaîne comme par exemple les ScFv.

Comme indiqué plus haut, l'acide désoxyribonucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des micro-organismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du "syncytia forming virus", du virus de la grippe, du cytomégalovirus (CMV), d'autres virus ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Préférentiellement, l'acide désoxyribonucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène d'intérêt thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule transfectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces

séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc... Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Une triple hélice correspond à la fixation d'un oligonucléotide modifié ou non sur de l'ADN double brin par des liaisons hydrogènes dites "de Hoogsteen" entre les bases du troisième brin et celles de la région en double hélice. Ces appariements se produisent dans le grand sillon de la double hélice et sont spécifiques de la séquence considérée [Frank-Kamenetski, M.D., *Triplex DNA Structures*, Ann. Rev. Biochem., 1995, 64, pp. 65-95]. La séquence spécifique en double hélice peut notamment être une séquence homopurique-homopyrimidique. On distingue deux catégories de triples hélices suivant la nature des bases du troisième brin [Sun, J. and C. Hélène, *Oligonucleotide-directed triple-helix formation*, Curr. Opin. Struct. Biol., 1993, 3, pp. 345-356] : les bases puriques permettent d'obtenir des appariements C-G*G et T-A*A, et les bases pyrimidiques permettent d'obtenir des appariements C-G*C⁺ et T-A*T (le symbole * correspond à l'appariement avec le troisième brin).

Ces structures ont été caractérisées du point de vue physico-chimique grâce à de nombreuses études de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), de température d'hybridation ou de protection à des nucléases, ce qui a permis de définir leurs propriétés et leurs conditions de stabilité. Pour les triples hélices avec un troisième brin purique, ce brin est antiparallèle par rapport au brin purique de l'ADN et la formation de la triple hélice dépend fortement de la concentration en ions divalents : les ions tels que Mg²⁺ stabilisent la structure formée avec le troisième brin. Pour les triples hélices avec un troisième brin homopyrimidique, celui-ci est parallèle par rapport au brin purique, et la formation de la triple hélice est dépendante du pH : un pH acide inférieur à six permet la protonation des cytosines et la formation d'une liaison hydrogène supplémentaire stabilisant le triplet C-G*C⁺. Il existe également des triples hélices "mixtes" pour lesquelles le troisième brin porte des bases puriques et pyrimidiques. Dans ce cas, l'orientation du troisième brin dépend de la séquence de bases de la région homopurique.

Les oligonucléotides utilisés dans la présente invention sont des oligonucléotides hybridant directement avec l'ADN double brin. Ces oligonucléotides peuvent contenir les bases suivantes :

- thymidine (T), qui est capable de former des triplets avec les doublets A.T de l'ADN double brin (Rajagopal et al, Biochem 28 (1989) 7859);
- adénine (A), qui est capable de former des triplets avec les doublets A.T de l'ADN double brin;
- guanine (G), qui est capable de former des triplets avec les doublets G.C de l'ADN double brin;
- cytosine protonée (C^+), qui est capable de former des triplets avec les doublets G.C de l'ADN double brin (Rajagopal et al précitée);
- uracile (U) qui est capable de former des triplets avec les paires de bases A.U ou A.T.

Pour permettre la formation d'une triple hélice par hybridation, il est important que l'oligonucléotide et la séquence spécifique présente sur l'ADN soient complémentaires. A cet égard, pour obtenir les meilleures fixations et la meilleure sélectivité, on utilise pour le vecteur selon l'invention un oligonucléotide et une séquence spécifique parfaitement complémentaires. Il peut s'agir en particulier d'un oligonucléotide poly-CTT et d'une séquence spécifique poly-GAA. A titre d'exemple, on peut citer l'oligonucléotide de séquence : 5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (GAGG(CTT)₇, SEQ ID N°1), dans lequel les bases GAGG ne forment pas de triples hélice mais permettent d'espacer l'oligonucléotide du bras de couplage. On peut également citer la séquence (CTT)₇ (SEQ ID N°2). Ces oligonucléotides sont capables de former une triple hélice avec une séquence spécifique comportant des motifs complémentaires (GAA). Il peut s'agir en particulier d'une région comportant 7, 14, ou 17 motifs GAA. Une autre séquence d'intérêt spécifique est la séquence : 5'-AAGGGAGGGAGGAGAGGAA-3' (SEQ ID n°3). Cette séquence forme une triple hélice avec les oligonucléotides : 5'-AAGGAGAGGAGGGAGGGAA-3' (SEQ ID n°4) ou

5'-TTGGTGTGGTGGGTGGGT-3' (SEQ ID n°5).

Dans ce cas, l'oligonucléotide se fixe dans une orientation antiparallèle au brin polypurique. Ces triples hélices ne sont stables qu'en présence de Mg^{2+} comme cela a été précisé précédemment (Vasquez et al., Biochemistry, 1995, 34, 7243-7251 ; Beal et Dervan, Science, 1991, 251, 1360-1363).

La séquence spécifique peut être une séquence présente naturellement sur l'ADN double brin, ou une séquence synthétique ou d'origine naturelle introduite artificiellement dans celui-ci. Il est particulièrement intéressant d'utiliser un oligonucléotide capable de former une triple hélice avec une séquence présente naturellement sur l'ADN double brin. En effet, cela permet avantageusement d'obtenir les vecteurs selon l'invention avec des plasmides non-modifiés, notamment des plasmides commerciaux de type pUC, pBR322, pSV, etc... Parmi les séquences homopuriques-homopyrimidiques naturelles présentes sur l'ADN double brin, on peut citer une séquence comprenant tout ou partie de la séquence 5'-CTTCCCGAAGGGAGAAAGG-3' (SEQ ID n°6) présente dans l'origine de répllication ColE1 de E. coli. Dans ce cas, l'oligonucléotide formant la triple hélice possède la séquence : 5'-GAAGGGTTCTTCCCTCTTTCC-3' (SEQ ID n°7) et se fixe alternativement sur les deux brins de la double hélice, comme décrit par Beal et Dervan (J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 4976-4982) et Jayasena et Johnston (Nucleic Acids Res. 1992, 20, 5279-5288). On peut aussi citer la séquence 5'-GAAAAAGGAAGAG-3' (SEQ ID n°8) du gène de la β -lactamase du plasmide pBR322 (Duval-Valentin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 504-508). Une autre séquence est AAGAAAAAAAGAA (SEQ ID N° 9) présente dans l'origine de répllication γ des plasmides à origine de répllication conditionnelle tel que pCOR.

Bien que des séquences parfaitement complémentaires soient préférées, il est entendu toutefois que certains mésappariements peuvent être tolérés entre la séquence de l'oligonucléotide et la séquence présente sur l'ADN, dès lors qu'ils ne conduisent pas à une perte trop grande d'affinité. On peut citer la séquence 5'-AAAAAAGGGGAATAAGGG-3' (SEQ ID n°10) présente dans le gène de la β -

lactamase de *E. coli*. Dans ce cas, la thymine interrompant la séquence polypurique peut être reconnue par une guanine du troisième brin, formant ainsi un triplet ATG qui est stable quand il est encadré par deux triplets TAT (Kiessling et al., *Biochemistry*, 1992, 31, 2829-2834).

5 L'oligonucléotide utilisé peut être naturel (composé de bases naturelles, non modifiées) ou modifiées chimiquement. En particulier, l'oligonucléotide peut présenter avantageusement certaines modifications chimiques permettant d'augmenter sa résistance ou sa protection vis-à-vis des nucléases, ou son affinité vis-à-vis de la séquence spécifique.

10 Selon la présente invention on entend aussi par oligonucléotide tout enchaînement de nucléosides ayant subi une modification du squelette. Parmi les modifications possibles on peut citer, les oligonucléotides phosphorothioates qui sont capable de former des triples hélices avec l'ADN (Xodo et al., *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, 3322-3330), de même que les oligonucléotides possédant des squelettes
15 formacétal ou méthylphosphonate (Matteucci et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 7767-7768). On peut également utiliser les oligonucléotides synthétisés avec des α -anomères de nucléotides, qui forment également des triples hélices avec l'ADN (Le Doan et al., *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15, 7749-7760). Une autre modification du squelette est la liaison phosphoramidate. On peut citer par exemple la liaison
20 internucléotidique N3'-P5' phosphoramidate décrite par Gryaznov et Chen, qui donne des oligonucléotides formant avec l'ADN des triples hélices particulièrement stables (*J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 3143-3144). Parmi les autres modifications du squelette, on peut citer également l'utilisation de ribonucléotides, de 2'-O-méthylribose, de phosphotriester,...(Sun et Hélène, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 116,
25 3143-3144). Le squelette phosphoré peut enfin être remplacé par un squelette polyamide comme dans les PNA (Peptide Nucleic Acid), qui peuvent également former des triples hélices (Nielsen et al., *Science*, 1991, 254, 1497-1500 ; Kim et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 6477-6481) ou par un squelette à base de guanidine, comme dans les DNG (déoxyribonucleic guanidine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

1995, 92, 6097-6101), analogues polycationiques de l'ADN, qui forment également des triples hélices.

La thymine du troisième brin peut aussi être remplacée par une 5-bromouracile, ce qui augmente l'affinité de l'oligonucléotide pour l'ADN (Povsic et Dervan, J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 3059-3061). Le troisième brin peut également
 5 contenir des bases non naturelles, parmi lesquelles on peut citer la 7-déaza-2'-déoxyxanthosine (Milligan et al., Nucleic Acids Res., 1993, 21, 327-333), la 1-(2-déoxy-b-D-ribofuranosyl)-3-méthyl-5-amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine-7-one (Koh et Dervan, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 1470-1478), la 8-oxoadénine, la 2-aminopurine, la 2'-O-méthyl-pseudoisocytidine, ou toute autre modification connue
 10 de l'homme du métier (voir pour revue Sun et Hélène, Curr. Opinion Struct. Biol., 1993, 3, 345-356).

Un autre type de modification de l'oligonucléotide a plus particulièrement pour objet d'améliorer l'interaction et/ou l'affinité entre l'oligonucléotide et la séquence
 15 spécifique. En particulier, une modification tout à fait avantageuse consiste à coupler un agent alkylant à l'oligonucléotide. La liaison peut se faire soit chimiquement, soit photochimiquement par l'intermédiaire d'un groupement fonctionnel photoréactif. Des agents alkylants avantageux sont notamment photoactivables, par exemple les psoralènes. Sous l'action de la lumière, ils forment des liaisons covalentes au niveau
 20 de bases pyrimidiques de l'ADN. Quand ces molécules sont intercalées au niveau de séquences 5'-ApT-3' ou 5'-TpA-3' dans un fragment d'ADN double brin, ils forment des liens avec les deux brins. Cette réaction de liaison induite par la lumière peut se produire spécifiquement sur un site du plasmide.

Un avantage de la présente invention est donc la possibilité de former des
 25 triples hélices très stables et site-spécifiques entre l'oligonucléotide et l'ADN double brin grâce à une liaison covalente formée via un agent alkylant.

La longueur de l'oligonucléotide utilisé dans le procédé de l'invention est d'au moins 3 bases, et de préférence, comprise entre 5 et 30 bases. On utilise de manière avantageuse un oligonucléotide de longueur supérieure à 10 bases. La longueur peut

être adaptée au cas par cas par l'homme du métier en fonction de la sélectivité et de la stabilité de l'interaction recherchées.

Les oligonucléotides selon l'invention peuvent être synthétisés par toute technique connue. En particulier, ils peuvent être préparés au moyen de synthétiseurs d'acides nucléiques. Toute autre méthode connue de l'homme du métier peut bien évidemment être utilisée.

Les oligonucléotides selon l'invention présentent par ailleurs un autre type de modification dont l'objet est de diriger l'ADN double brin vers des cellules ou des compartiments cellulaires spécifiques. En particulier, cette modification consiste à coupler un signal de ciblage à l'extrémité libre de l'oligonucléotide.

Un autre avantage de la présente invention est qu'il est désormais possible, grâce à la formation de triples hélices site-spécifiques très stables, de lier un signal de ciblage à un ADN double brin de façon site-spécifique. En conséquence, il est possible de fixer le signal de ciblage en dehors de la cassette d'expression du gène à transférer. La demanderesse a ainsi montré que l'expression génétique dans la cellule n'est pas inhibée malgré la modification chimique de l'ADN. De plus, la présence d'une triple hélice comme moyen pour lier le signal de ciblage à l'ADN est particulièrement avantageuse car cela permet de conserver une taille d'ADN à transférer adaptée.

Selon une autre variante de l'invention, il est possible de contrôler le nombre de signaux de ciblage liés à chaque molécule d'ADN double brin en introduisant un nombre adapté de séquences spécifiques sur ladite molécule d'ADN double brin. De la même façon, il est possible d'introduire sur une même molécule d'ADN double brin plusieurs oligonucléotides liés à des signaux de ciblage différents (intracellulaires et/ou extracellulaires). En outre, ces différents signaux de ciblage peuvent être fixés à la molécules d'ADN double brin avec différents degré de stabilité dans leur liaison suivant que la triple hélice est formée avec ou sans liaison covalente via un agent alkylant.

Les signaux de ciblage peuvent être de nature très variée. Ils peuvent être utilisés pour interagir avec un composant de la matrice extracellulaire, un récepteur de la membrane plasmique, pour cibler un compartiment intracellulaire ou pour améliorer le trafic intracellulaire d'ADN, lors du transfert de gènes non viral en
5 thérapie génique.

Ces signaux de ciblage peuvent comprendre par exemple les facteurs de croissance (EGF, PDGF, TGF β , NGF, IGF I, FGF), les cytokines (IL-1, IL-2, TNF, Interferon, CSF), les hormones (insuline, hormone de croissance, prolactine, glucagon, hormone thyroïdienne, hormones stéroïdiennes), les sucres qui
10 reconnaissent des lectines, les immunoglobulines, les ScFv, la transferrine, les lipoprotéines, les vitamines telles que la vitamine B12, les hormones peptidiques ou les neuropeptides (tachykinines, neurotensine, VIP, endothéline, CGRP, CCK, ...), ou tout motif reconnu par les intégrines, par exemple le peptide RGD, ou par d'autres protéines extrinsèques de la membrane cellulaire.

15 On peut utiliser des protéines entières, ou des séquences peptidiques dérivées de ces protéines, ou encore des peptides se fixant sur leur récepteur et obtenus par la technique de "phage display" ou par synthèse combinatoire.

Des signaux de ciblage intracellulaires peuvent être envisagés. Beaucoup de séquences d'adressage nucléaire (NLS) de composition en acides aminés variée ont
20 été identifiées et permettent de cibler différentes protéines impliquées dans le transport nucléaire de protéines ou d'acides nucléiques. Parmi ces séquences figurent notamment des séquences courtes (le NLS de l'antigène T de SV40 (PKKKRKV, SEQ ID N°11) est un exemple), des séquences bipartites (le NLS de la nucléoplasmine qui contient deux domaines essentiels pour le transport nucléaire :
25 KRPAATKKAGQAKKKKLDK, SEQ ID N°12), ou la séquence M9 (NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY, SEQ ID N°13) de la protéine hnRNPA1. Les protéines portant ces séquences NLS se fixent sur des récepteurs spécifiques, tels que les récepteurs de la famille des importines ou karyophérines par exemple. Le rôle de ces séquence est de diriger l'ADN à l'intérieur

du noyau, où il est alors immédiatement disponible pour la machinerie de transcription, et peut être exprimé.

Les signaux de ciblage "mixtes", c'est-à-dire qui peuvent à la fois servir pour le ciblage intracellulaire et extracellulaire, entrent également dans le cadre de la présente invention. On peut par exemple citer les sucres qui ciblent des lectines qui se situent sur la membrane cellulaire mais également au niveau des pores nucléaire. Le ciblage par ces sucres concerne donc aussi bien le ciblage extracellulaire que l'import nucléaire.

D'autres signaux sont impliqués dans le ciblage mitochondrial (par exemple, la partie N-terminale de l'ornithine transcarbamylase (OTC) de rat permet le ciblage des mitochondries) ou dans l'adressage vers le réticulum endoplasmique. Enfin, certains signaux permettent la rétention nucléaire ou au niveau du réticulum endoplasmique (tels que la séquence KDEL).

Avantageusement, les peptides selon l'invention permettent de cibler spécifiquement certaines cellules ou certains compartiments cellulaires. A titre d'exemple, les peptides selon l'invention peuvent cibler des récepteurs ou des ligands à la surface de la cellule, notamment les récepteurs de l'insuline, de la transferrine, de l'acide folique, ou tout autre facteur de croissance, cytokines, ou vitamines, ou des polysaccharides particuliers à la surface de la cellule ou sur la matrice extracellulaire avoisinante.

La synthèse de chimères oligonucléotide-peptide se fait en phase solide ou en solution et tient compte des propriétés de stabilité très différentes des oligonucléotides et des peptides [Erijita, R. et al., *Synthesis of defined peptide-oligonucleotide hybrids containing a nuclear transport signal sequence*, Tetrahedron, 1991, 47(24), pp. 4113-4120]. En solution, des couplages en une étape sont envisageables : le signal de ciblage peut par exemple être synthétisé avec un groupement portant des fonctions disulfure, maléimide, amine, carboxyle, ester, époxyde, bromure de cyanogène, ou aldéhyde, et être couplé à un oligonucléotide modifié par un groupement terminal thiol, amine, ou carboxyle en position 3' ou 5'. Ces couplages se forment par

établissement de liaisons disulfure, thioéther, ester, amide, ou amine entre l'oligonucléotide et le signal de ciblage. Toute autre méthode connue de l'homme du métier peut être utilisée, telle que les réactifs de couplage bifonctionnel par exemple.

Un autre objet de l'invention concerne les compositions pharmaceutiques
5 comprenant un vecteur tel que défini précédemment.

Avantageusement, les vecteurs selon l'invention peuvent être associés à un ou plusieurs agents connus pour transfecter l'ADN. On peut citer à titre d'exemple les lipides cationiques qui possèdent des propriétés intéressantes. Ces vecteurs sont constitués d'une partie polaire, cationique, interagissant avec l'ADN, et d'une partie
10 lipidique, hydrophobe, favorisant la pénétration cellulaire. Des exemples particuliers de lipides cationiques sont notamment les lipides monocationiques (DOTMA : Lipofectin®), certains détergents cationiques (DDAB), les lipopolyamines et en particulier la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) ou la 5-carboxyspermylamide de la palmitoylphosphatidyléthanolamine (DPPEs) dont la préparation a été décrite
15 par exemple dans la demande de brevet EP 394 111. Une autre famille intéressante de lipopolyamines est représentée par les composés décrits dans la demande de brevet WO 97/18185 incorporée à la présente par référence. De nombreux autres lipides cationiques ont été développés et peuvent être utilisés avec les vecteurs selon l'invention.

20 Parmi les agents de transfection synthétiques développés, les polymères cationiques de type polylysine et DEAE dextran sont également avantageux. Il est aussi possible d'utiliser les polymères de polyéthylène imine (PEI) et de polypropylène imine (PPI) qui sont accessibles commercialement et peuvent être préparés selon le procédé décrit dans la demande de brevet WO 96/02655.

25 D'une manière générale, tout agent connu pour transfecter l'acide nucléique peut être associé aux vecteurs selon l'invention.

Les compositions peuvent en outre comporter des adjuvants capables de s'associer aux complexes vecteur selon l'invention/agent de transfection et d'en

améliorer le pouvoir transfectant. Dans un autre mode de mise en oeuvre, la présente invention concerne donc des compositions comprenant un vecteur tel que défini précédemment, un ou plusieurs agents de transfection tels que définis ci-avant et un ou plusieurs adjuvants capables de s'associer aux complexes vecteur/agent(s) de transfection et d'en améliorer le pouvoir transfectant. La présence de ce type d'adjuvant (lipides, peptides ou protéines par exemple) peut permettre avantageusement d'augmenter le pouvoir transfectant des composés.

Dans cette optique, les compositions de l'invention peuvent comprendre comme adjuvant, un ou plusieurs lipides neutres dont l'utilisation est particulièrement avantageuse. La demanderesse a en effet montré que l'addition d'un lipide neutre permet d'améliorer la formation des particules nucléolipidiques et de favoriser la pénétration de la particule dans la cellule en déstabilisant sa membrane.

Plus préférentiellement, les lipides neutres utilisés dans le cadre de la présente invention sont des lipides à 2 chaînes grasses. De manière particulièrement avantageuse, on utilise des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologique. Il peuvent être choisis plus particulièrement parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoyl-palmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérebrosides (tels que notamment les galactocérebrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

Ces différents lipides peuvent être obtenus soit par synthèse, soit par extraction à partir d'organes (exemple : le cerveau) ou d'oeufs, par des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'extraction des lipides naturels peut être réalisée au moyen de solvants organiques (voir également Lehninger, Biochemistry).

La demanderesse a démontré qu'il était également particulièrement avantageux d'employer à titre d'adjuvant, un composé intervenant ou non directement au niveau de la condensation de l'ADN (WO 96/25508). La présence d'un tel composé, au sein d'une composition selon l'invention permet de diminuer la quantité de composé transfectant, avec les conséquences bénéfiques qui en découlent sur le plan toxicologique, sans porter un préjudice quelconque à l'activité transfectante. Par composé intervenant au niveau de la condensation de l'acide nucléique, on entend définir un composé compactant, directement ou non, l'ADN. Plus précisément, ce composé peut soit agir directement au niveau de l'ADN à transfecter soit intervenir au niveau d'un composé annexe qui lui est directement impliqué dans la condensation de cet acide nucléique. De préférence, il agit directement au niveau de l'ADN. Selon un mode de réalisation préféré, cet agent intervenant au niveau de la condensation de l'ADN est constitué, en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10. Dans la structure du composé selon l'invention, ces motifs peuvent être répétés de manière continue ou non. C'est ainsi qu'ils peuvent être séparés par des liens de nature biochimique, par exemple un ou plusieurs acides aminés ou de nature chimique. Un tel agent peut également dériver en tout ou partie d'une histone, d'une nucléoline, d'une protamine et/ou de l'un de leurs dérivés.

L'invention a également pour objet l'utilisation des vecteurs tels que définis ci-avant pour la transfection d'ADN dans des cellules primaires ou dans des lignées cellulaires établies. Il peut s'agir de cellules fibroblastiques, musculaires, nerveuses (neurones, astrocytes, cellules gliales), hépatiques, de la lignée hématopoïétique (lymphocytes, CD34, dendritiques, etc...), épithéliales, etc..., sous forme différenciées ou pluripotentes (précurseurs).

Les vecteurs de l'invention peuvent à titre illustratif être utilisés pour la transfection *in vitro* ou *in vivo* d'ADN codant pour des protéines ou des polypeptides.

Pour des utilisations *in vivo*, soit en thérapie soit pour l'étude de la régulation de gènes ou la création de modèles animaux de pathologies, les compositions selon

l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, intratrachéale, intrapéritonéale, etc... De préférence, les compositions de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. En ce qui concerne plus particulièrement le mode d'administration, il peut s'agir soit d'une injection directe dans les tissus ou les voies circulatoires, soit d'un traitement de cellules en culture suivi de leur réimplantation *in vivo*, par injection ou greffe.

L'invention concerne en outre une méthode de transfection d'ADN dans les cellules comprenant les étapes suivantes :

- (1) synthèse de la chimère oligonucléotide - signal de ciblage selon le procédé décrit précédemment,
- (2) mise en contact de la chimère synthétisée en (1) avec un ADN double brin pour former des triples hélices,
- (3) complexation du vecteur obtenu en (2) avec un ou plusieurs agents de transfection et/ou un ou plusieurs adjuvant(s), et
- (4) mise en contact des cellules avec le complexe formé en (3).

La mise en contact des cellules avec le complexe peut être réalisée par incubation des cellules avec ledit complexe (pour des utilisations *in vitro* ou *ex vivo*), ou par injection du complexe dans un organisme (pour des utilisations *in vivo*).

La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement avantageuse pour la transfection d'ADN *in vivo*, ou *in vitro*, notamment pour le traitement de maladies, comprenant l'administration *in vivo* ou *in vitro* d'un vecteur selon l'invention contenant un acide nucléique apte à corriger ladite maladie. Plus
 5 particulièrement, cette méthode est applicable aux maladies résultant d'une déficience en un produit protéique ou peptidique, l'ADN administré codant pour ledit produit protéique ou peptidique. La présente invention s'étend à toute utilisation d'un vecteur selon l'invention pour la transfection *in vivo* ou *in vitro* de cellules.

L'invention concerne également toute cellule recombinante contenant un
 10 vecteur tel que défini ci-avant. Il s'agit préférentiellement de cellules eucaryotes, par exemple des levures, des cellules animales, etc... Ces cellules sont obtenues par toute technique permettant l'introduction d'un ADN dans une cellule donnée et connue de l'homme du métier.

Les exemples suivants destinés à illustrer l'invention sans en limiter la portée,,
 15 permettent de mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

FIGURES

Figure 1 : Couplage d'un oligonucléotide (ODN) et du peptide maléimide-NLS.

Figure 2 : Analyse sur gel de polyacrylamide 15% de la chimère oligonucléotide -
 20 peptide (Pso-GA₁₉-NLS) par action protéolytique de la trypsine.

1 = oligo Pso-GA₁₉-SH

2 = chimère oligonucléotide-peptide Pso-GA₁₉-NLS

3 = chimère oligonucléotide-peptide Pso-GA₁₉-NLS après digestion par la trypsine

Figure 3 : représentation schématique du plasmide pXL2813.

25 Figure 4 : représentation schématique du plasmide pXL2652.

L'oligonucléotide pso-GA₁₉-NLS et le plasmide sont mélangés dans un tampon contenant 100 mM de MgCl₂. L'excès en molarité de l'oligonucléotide par rapport au plasmide varie de 0 à 200. Le mélange est photoactivé, après une nuit à 37°C, puis digéré par deux enzymes de restriction qui coupent le plasmide de part et d'autre de la région de formation des triples hélices.

1 = pas d'oligonucléotide

2 = excès en molarité d'oligonucléotide par rapport au plasmide de 15

3 = excès en molarité d'oligonucléotide par rapport au plasmide de 50

4 = excès en molarité d'oligonucléotide par rapport au plasmide de 100

10 5 = excès en molarité d'oligonucléotide par rapport au plasmide de 200

6 = oligonucléotide seul photoactivé

7 = oligonucléotide seul non photoactivé

8 = excès en molarité d'oligonucléotide par rapport au plasmide de 30, le mélange n'ayant pas été photoactivé.

15 Figure 6 : Expression du transgène (β -galactosidase) pour des essais effectués avec le plasmide pXL2813 seul, le vecteur pXL2813-Pso-GA₁₉-NLS, et sans plasmide.

Figure 7 : Caractérisation de la partie peptidique de la chimère oligonucléotide-peptide Pso-GA₁₉-NLS par interaction avec l'importine 60-GST (analyse sur gel de polyacrylamide 15%).

20 1 = oligo Pso-GA₁₉ (1 μ g)

2 = chimère oligonucléotide-peptide Pso-GA₁₉-NLS (1 μ g)

3 = surnageant récupéré après incubation des billes-glutathion recouvertes d'importines 60 et de l'oligonucléotide Pso-GA₁₉, et séparation du culot de billes (contenant les éléments interagissant avec les importines) du surnageant

25 4 = culot récupéré après incubation des billes-glutathion recouvertes d'importines 60 et de l'oligonucléotide Pso-GA₁₉, et séparation du culot de billes (contenant les éléments interagissant avec les importines) du surnageant

5 = surnageant récupéré après incubation des billes-glutathion recouvertes d'importines 60 et de la chimère oligonucléotide-peptide Pso-GA₁₉-NLS, et séparation du

culot de billes (contenant les éléments interagissant avec les importines) du surnageant

- 6 = culot récupéré après incubation des billes-glutathion recouvertes d'importines 60 et de la chimère oligonucléotide-peptide Pso-GA₁₉-NLS, et séparation du culot de billes (contenant les éléments interagissant avec les importines) du surnageant.

Figure 8 : Analyse sur gel de polyacrylamide 15% de la chimère oligonucléotide-peptide (GA₁₉-NLS) par action protéolytique de la trypsine.

- 1 = oligo GA₁₉-SH (200 ng)
 2 = chimère oligonucléotide-peptide GA₁₉-NLS (1µg) avant purification par chromatographie liquide à haute pression
 3 = chimère oligonucléotide-peptide GA₁₉-NLS (1µg) après purification
 4 = chimère oligonucléotide-peptide GA₁₉-NLS après digestion par la trypsine (1µg).

Figure 9 : Représentation graphique de la cinétique de formation des triples hélices (% de sites de triples hélices occupé en fonction du temps) entre le plasmide pXL2813 et la chimère GA₁₉-NLS.

Figure 10 : Caractérisation de la partie peptidique de la chimère oligonucléotide-peptide GA₁₉-NLS par interaction avec l'importine 60-GST.

- 1 = chimère oligonucléotide-peptide GA₁₉-NLS,
 2 = oligo GA₁₉,
 3 = surnageant récupéré après incubation des billes-glutathion recouvertes d'importines 60 et de la chimère oligonucléotide-peptide GA₁₉-NLS, et séparation du culot de billes (contenant les éléments interagissant avec les importines) du surnageant,
 4 = culot récupéré après incubation des billes-glutathion recouvertes d'importines 60 et de la chimère oligonucléotide-peptide GA₁₉-NLS, et séparation du culot de billes (contenant les éléments interagissant avec les importines) du surnageant,
 5 = surnageant récupéré après incubation des billes-glutathion recouvertes d'importines 60 et de l'oligonucléotide GA₁₉ et séparation du culot de billes (contenant les éléments interagissant avec les importines) du surnageant,

6 = culot récupéré après incubation des billes-glutathion recouvertes d'importines 60 et de l'oligonucléotide GA₁₉, et séparation du culot de billes (contenant les éléments interagissant avec les importines) du surnageant.

MATERIEL ET METHODES

5 **1. Couplage des oligonucléotides et des peptides**

Les oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés ont une longueur de 19 bases et leur séquence commune est 5'-AAGGAGAGGAGGGAGGGAA-3' (SEQ ID N°4). Ces oligonucléotides sont référencés sous le nom GA₁₉ dans la suite du texte.

- 10 Les oligonucléotides notés GA₁₉-SH ont la même séquence et un groupement thiol à l'extrémité 5', avec un espaceur de six carbones entre le thiol et le phosphate de l'extrémité 5'. Les oligonucléotides notés Pso-GA₁₉-SH ont un groupement thiol à l'extrémité 3', et en plus, un psoralène à l'extrémité 5', avec un espaceur de six carbones entre le psoralène et le phosphate de l'extrémité 5'. Les oligonucléotides
- 15 notés Pso-GA₁₉ n'ont pas de groupement thiol.

La nomenclature utilisée est résumée dans le tableau I ci-dessous :

nom de l'oligonucléotide	modification de l'extrémité 3'	modification de l'extrémité 5'
GA ₁₉	aucune	aucune
GA ₁₉ -SH	aucune	groupement thiol
Pso-GA ₁₉	aucune	psoralène
Pso-GA ₁₉ -SH	groupement thiol	psoralène

Tableau I

Ces oligonucléotides lyophilisés sont repris dans un tampon acétate de triéthylammonium 100 mM, pH = 7.

Les peptides

Les peptides utilisés pour les couplages sont synthétisés par un automate en phase solide. Ils contiennent :

- soit la séquence de localisation nucléaire de l'antigène T de SV40 (PKKKRKV, SEQ ID N°11),
- soit la même séquence mutée (PKNKRKV, SEQ ID N°14) qui ne permet ni le ciblage ni le transport nucléaire (du fait de la mutation).

Ces peptides portent également un espaceur de quatre acides aminés à l'extrémité N-terminale : KGAG. La lysine N-terminale est modifiée chimiquement: elle contient un groupement maléimide sur le carbone ϵ et un groupement protecteur 9-fluorenylméthoxycarbonyl (Fmoc) sur l'amine du carbone α . Ce groupement Fmoc absorbe à 260 nm ce qui permet de suivre le peptide par chromatographie liquide à haute pression en phase inverse. Le groupement C-terminal est également protégé (groupement CONH₂), la protection étant ajoutée en fin de synthèse peptidique.

- La représentation des peptides est indiquée dans le tableau II ci-dessous :

nom du peptide	séquence et modifications
maléimide-NLS	maléimide—KGAGPKKKRKV—CONH ₂ Fmoc
maléimide-NLSmuté	maléimide—KGAGPKNKRKV—CONH ₂ Fmoc

Tableau II

Les peptides lyophilisés sont repris dans un tampon acétate de triéthylammonium 100 mM, pH = 7. La concentration est de 0,4 mg/ml.

Les couplages

- Pour le couplage avec les oligonucléotides, la stratégie utilisée consiste à faire réagir le groupement thiol porté par l'oligonucléotide et le groupement maléimide porté par

containing a nuclear transport signal sequence. Tetrahedron, 1991, 47(24), pp. 4113-4120].

L'oligonucléotide est ajouté à la solution de peptide de façon équimolaire et le milieu réactionnel est laissé deux heures à température ambiante. La chimère
 5 oligonucléotide-peptide est purifiée par chromatographie liquide à haute pression en phase inverse, sur colonne Vydac C8 contenant de la silice sphéroïdale de diamètre 5 μm et de porosité 300 Å. On utilise un tampon acétate de triéthylammonium (TEAA) 0,1 M et un gradient d'acétonitrile passant de 5% à 50% en 35 minutes. Les produits sont détectés à 260 nm.

10 Analyse des chimères par digestion à la trypsine

Les conjugués oligonucléotide-peptide sont soumis à l'action protéolytique de la trypsine qui permet de mettre en évidence la partie peptidique de la chimère [Reed, M.W. et al, *Synthesis and evaluation of nuclear targeting peptide-antisense oligodeoxynucleotide conjugates*, Bioconjugate Chemistry, 1995, 6, pp.101-108]. Des
 15 solutions contenant 1 μg d'oligonucléotide-peptide dans 7 μl de tampon de purification tréthylammonium (TEAA) 0,1 M sont mélangés à 1 μl d'une solution de trypsine (5 mg/ml). On y ajoute 1 μl de tampon Tris 100 mM, HCl pH = 9, et 1 μl d'EDTA 500 mM. Après une digestion d'une heure, les échantillons sont déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide à 15%, urée 7 M. L'électrophorèse est faite
 20 en tampon Tris 100 mM, acide borique 90 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,3. Les acides nucléiques sont révélés par une coloration à l'argent grâce à un kit Biorad.

2 . Formation de triples hélices avec les chimères

Le plasmide

Le plasmide utilisé pour étudier la formation de triples hélices avec les chimères
 25 oligonucléotide-peptide est appelé pXL2813 (7257 pb). Ce plasmide exprime le gène de la β -galactosidase sous contrôle du promoteur fort des gènes précoces du Cytomégalo virus (CMV), ainsi que le gène de résistance à l'Ampicilline.

En amont du promoteur, entre les positions 7238 et 7256, la séquence GA₁₀ (5'-AAGGAGAGGAGGGAGGGAA-3', SEQ ID N°2) a été clonée selon les méthodes classiques de biologie moléculaire.

Elle a été clonée dans le plasmide pXL2652 (de 7391 pb et dont la représentation est schématisée dans la figure 4) qui exprime le gène de la β -Galactosidase sous contrôle du promoteur fort des gènes précoces du Cytomégalo virus (CMV), ainsi que le gène de résistance à l'Ampicilline. Ce promoteur provient de pCDNA3, le gène LacZ et son polyA proviennent de pCH110, et le reste provient de pGL2.

Les séquences ont été clonées en amont du promoteur entre les sites uniques de coupure des enzymes MunI et XmaI. Pour cela, les deux oligonucléotides complémentaires contenant la séquence à cloner 6651 (5'-AATTGATTCCTCTCCTCCCTCCCTTAC-3') et 6652 (3'-CTAAGGAGAGGAGGGAGGGGAATGGG-5') ont été chauffés pendant 5 minutes à 95°C, puis hybridés en laissant la température redescendre lentement. Le plasmide pXL2652 a ensuite été digéré par les enzymes MunI et XmaI, pendant 2 heures à 37°C, et les produits de cette double digestion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% et coloration au bromure d'éthidium.

Le fragment d'intérêt pour la suite du clonage a été élué selon le protocole Jetsorb (Genomed) et 200 ng de ce fragment ont été reliés à 10 ng du mélange d'oligonucléotides hybridés par la T4 ligase, pendant 16 heures à 16°C.

Des bactéries E.Coli, compétentes, de souche DH5 α ont été transformées par électroporation avec le produit de la réaction, étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB et de l'Ampicilline. Les clones résistants à l'Ampicilline ont été sélectionnés et l'ADN a été extrait par lyse alcaline et analysé sur gel d'agarose à 1%.

Un clone correspondant, en taille, au produit attendu a été séquencé.

Formation des triples hélices

La formation des triples hélices s'effectue par mélange du plasmide pXL2813 (3 pmol de plasmide soit encore 15 μ g) et de quantités variables d'oligonucléotides ou de chimères dans un tampon Tris 100 mM, HCl pH = 7,5, et MgCl₂ 100 mM.

30 La photoactivation des triples hélices

Après une nuit d'incubation, le mélange est irradié, dans la glace, pendant 15 minutes, en utilisant une lampe monochromatique de longueur d'onde 365 nm (Biorad). Le produit de la photoactivation est digéré par les enzymes de restriction MfeI et SpeI et analysé sur un gel de polyacrylamide 15%, urée 7 M avec un tampon de migration

5 Tris 100 mM, acide borique 90 mM, EDTA 1 mM, et pH = 8,3. Les acides nucléiques sont révélés par une coloration à l'argent grâce à un kit Biorad [Musso, M., J.C. Wang, and M.W.V.Dyke, *In vivo persistence of DNA triple helices containing psoralen-conjugated oligodeoxyribonucleotides*, Nucleic Acid Research, 1996, 24(24), pp.4924-4932].

10 La méthode d'étude des triple hélices

Cette méthode est basée sur le principe de chromatographie d'exclusion de solutions contenant le plasmide et l'oligonucléotide susceptibles de former une triple hélice. Les colonnes d'exclusion utilisées (Columns, Linkers 6, Boehringer Mannheim) sont composées de billes de sépharose et ont pour limite d'exclusion 194 paires de bases ce

15 qui permet de retenir dans la colonne les oligonucléotides non appariés aux plasmides.

Dans un premier temps, les oligonucléotides sont marqués radioactivement en leur extrémité 3' par la Terminal Transferase à l'aide de dATP $\alpha^{35}\text{S}$. Le protocole utilisé provient d'Amersham : 10 pmol d'oligonucléotides sont incubés pendant 2 heures à

20 37°C, avec 50 μCi de dATP $\alpha^{35}\text{S}$ en présence de 10 unités de Terminal Transferase, dans un volume de 50 μl de tampon contenant du cacodylate de sodium. Le pourcentage d'oligonucléotides marqués est évalué selon la méthode suivante : 1 μl d'un échantillon dilué au 1/100 de la solution après marquage est déposé sur papier Whatman DE81, en double. L'un des deux papiers est lavé deux fois pendant 5

25 minutes avec du 2xSSC, pendant 30 secondes avec de l'eau et pendant 2 minutes avec de l'éthanol. Les radioactivités des deux papiers sont comparées. La radioactivité du papier lavé correspond au ^{35}S effectivement incorporé.

HCl pH = 7,5, 50 mM de $MgCl_2$) et la température (37°C) sont fixes tandis que le temps d'incubation varie de 1 à 24 heures. Les colonnes de sépharose sont équilibrées, avant utilisation, avec le tampon de réaction et centrifugées à 2200 tr/min pendant 4 minutes, pour les tasser. 25 µl du milieu réactionnel sont déposés sur les colonnes et celles-ci sont centrifugées dans les mêmes conditions que précédemment. 25 µl du tampon de réaction sont ensuite déposés sur les colonnes qui sont à nouveau centrifugées. L'éluat est récupéré.

La radioactivité contenue dans 5 µl du milieu réactionnel, notée cpm(dépôt), et celle contenue dans l'éluat, notée cpm(éluat), sont évaluées ce qui permet d'estimer le pourcentage d'oligonucléotides élués :

$$\% \text{ d'oligonucléotides élués} = \text{cpm(éluat)} / [5 \times \text{cpm(dépôt)}] \times 100.$$

Le pourcentage de plasmides qui sont effectivement élués au cours des expériences est évalué en estimant la densité optique à 260 nm de l'éluat et celle du dépôt, ce qui permet de calculer le pourcentage d'oligonucléotides fixés sur la totalité des plasmides:

$$\% \text{ d'oligonucléotides fixés} = [\% \text{ oligonucléotides élués} / \% \text{ plasmides élués}] \times 100.$$

Ce paramètre permet d'évaluer le pourcentage de sites de formation de triples hélices (il en existe un par plasmide pXL2813) qui sont effectivement occupés en tenant compte des concentrations de plasmides (notée [plasmide]) et d'oligonucléotides (notée [oligo]) utilisés lors de la réaction de formation des triple hélices :

$$\% \text{ sites triple hélice occupés} = \% \text{ d'oligonucléotides fixés} \times [\text{oligo}] / [\text{plasmide}].$$

3. Interaction avec les importines

Les protéines recombinantes

La sous-unité importine 60 utilisée pour étudier l'interaction avec les conjugués oligonucléotide-peptide (NLS ou NLSmuté) est d'origine murine et fusionnée à la Glutathion S-Transferase (GST). La séquence de l'importine 60 a été clonée dans un vecteur pGEX-2T pour la fusionner à la GST. La protéine recombinante a été produite

dans *Escherichia coli* [Imamoto, N. et al., *In vivo evidence for involvement of a 58kDa component of nuclearpore-targeting complex in nuclear protein import*, The EMBO Journal, 1995, 14(15), pp. 3617-3626].

Les interactions avec les protéines recombinantes

- 5 Toutes les expériences d'interaction sont menées dans le tampon de fixation (HEPES 20 mM, pH = 6,8, acétate de potassium 150 mM, acétate de magnésium 2 mM, DTT 2 mM, et BSA 100 µg/ml).

Dans un premier temps, les protéines recombinantes sont incubées en présence de billes de sépharose recouvertes de groupements glutathion (Pharmacia Biotech) 1 µg
10 de protéine recombinante est utilisé pour 10 µl de billes. Après une incubation de 30 minutes, à température ambiante, dans 500 µl de tampon de fixation, le mélange est centrifugé à 2000 G pendant 30 secondes, et le surnageant est enlevé. Les billes sont lavées cinq fois par resuspension dans 500 µl de tampon de fixation et centrifugation, comme décrit ci-avant. Les billes sont resuspendues dans du tampon de fixation pour
15 obtenir une suspension contenant 50% de billes recouvertes de protéines recombinantes.

Dans un second temps, 60 µl de la suspension contenant 50% de billes recouvertes de protéines recombinantes sont incubés avec 2 µg d'oligonucléotide ou d'oligonucléotide-peptide, dans un volume de 500 µl de tampon de fixation. Après
20 une incubation de 30 minutes, à température ambiante, le mélange est centrifugé à 2000G pendant 30 secondes, et le surnageant est enlevé. 30 µl du surnageant sont collectés pour analyser la fraction non fixée sur les billes. Les billes sont lavées cinq fois par resuspension dans 500 µl de tampon de fixation et centrifugation, comme décrit ci-avant. Les billes sont resuspendues dans 15 µl de tampon de charge (bleu de
25 bromophénol 0,05%, saccharose 40%, EDTA 0,1 M, pH = 8, sodium lauryl sulfate 0,5%) et chauffées 10 minutes à 90°C. Le contenu du surnageant et du culot est analysé sur un gel de polyacrylamide à 15%, urée 7 M, avec un tampon de migration Tris 100 mM, acide borique 90 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,3. Les acides nucléiques sont révélés par une coloration à l'argent grâce à un kit Biorad [Rexach, M. and G.

Blobel, *Protein import into nuclei : association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins*, Cell, 1995, 83, pp. 683-692].

4. Transfection de cellules

Culture cellulaire

- 5 Le type cellulaire utilisé est NIH 3T3 (ATCC CRL-1658). Il s'agit de fibroblastes de souris. Ces cellules sont cultivées dans un milieu Dulbecco modifié, avec du glucose 4,5 g/l (DMEM - Gibco), de la glutamine 2 mM, de la pénicilline (100 U/ml) et de la streptomycine (100 µg/ml), et 10% de sérum de veau foetal (Gibco). Elles sont incubées à 37°C dans une étuve à 5% de CO₂.

10 **La transfection**

- Un jour avant la transfection, les puits d'une plaque de 24 puits sontensemencés avec 50000 cellules par puit. Les vecteurs sont dilués dans du NaCl 150 mM et mélangés à un lipide cationique (le RPR 120535 décrit dans la demande brevet WO 97/18185), dilué dans du NaCl 150 mM. Le mélange se fait avec 6 nmol de lipide par
15 microgramme de plasmide. Ce mélange est dilué au 1/10 dans du milieu de culture sans sérum et déposé sur les cellules. Après une incubation à 37°C dans une étuve à 5% de CO₂ pendant deux heures, on ajoute 10% de sérum de veau foetal.

La quantification de la β-galactosidase

- Après une incubation de 48 heures, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et
20 lysées avec 250 µl de tampon de lyse (Promega). La β-galactosidase est quantifiée selon le protocole «Lumigal β-Galactosidase genetic reporter system » (Clontech). L'activité est mesurée sur un luminomètre Lumat LB9501 (Berthold). La quantité de protéines est mesurée avec le kit BCA (Pierce).

EXEMPLES

25 **Exemple 1**

Cet exemple illustre la possibilité de coupler l'oligonucléotide Pso-GA₁₉-SH au peptide maléimide-NLS.

L'oligonucléotide Pso-GA₁₉-SH, de séquence 5'-AAGGAGAGGAGGGAGGGAA-3', avec un groupement thiol à l'extrémité 3', a été couplé au peptide NLS qui porte un groupement maléimide à son extrémité N-terminale selon la méthode décrite précédemment dans la partie "Matériel et Méthodes" sous la section "couplage des
5 oligonucléotides et des peptides".

Le couplage est suivi par chromatographie liquide à haute pression (CLHP) en phase inverse. Il s'effectue avec une stoechiométrie équimolaire : en deux heures, le couplage est total, et la chimère est purifiée par CLHP.

Le schéma réactionnel du couplage est représenté à la Figure 1.

10 La chimère oligonucléotide-peptide (Pso-GA₁₉-NLS) a été analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide après action protéolytique de la trypsine qui permet de mettre en évidence la présence de la partie peptidique de la chimère, après migration sur gel de polyacrylamide dénaturant et coloration des acides nucléiques par l'argent (comme indiqué dans la partie "Matériel et méthodes" sous la section
15 "Analyse des chimères par digestion à la trypsine").

La chimère Pso-GA₁₉-NLS présente une migration électrophorétique retardée par rapport à l'oligonucléotide Pso-GA₁₉-SH, et le produit de la digestion protéolytique est visualisé à un niveau intermédiaire entre les niveaux de migration de Pso-GA₁₉-NLS et de Pso-GA₁₉-SH, comme cela apparaît sur la figure 2.

20 La chimère Pso-GA₁₉-NLS contient donc une partie peptidique accessible à la trypsine. Ces résultats montrent clairement que le couplage entre l'oligonucléotide et le peptide s'est opéré, et le rendement du couplage est important.

Exemple 2

25 Cet exemple illustre la formation de triples hélices entre le plasmide pXL2813 et la chimère Pso-GA₁₉-NLS qui est modifiée par un agent alkylant photoactivable. Cet exemple indique également quelle est la proportion de plasmides modifiés selon l'excès en molarité d'oligonucléotides par rapport au plasmide.

oligonucléotides GA₁₉, Pso-GA₁₉, Pso-GA₁₉-SH ou Pso-GA₁₉-NLS. Les cations divalents, tel que Mg²⁺, stabilisent ces triples hélices. L'oligonucléotide Pso-GA₁₉-NLS et le plasmide sont mélangés dans un tampon contenant 100 mM de MgCl₂. L'excès en molarité d'oligonucléotide par rapport au plasmide varie de 0 à 200.

- 5 Après incubation pendant 12 heures à 37°C, le mélange est photoactivé pendant 15 minutes (comme indiqué dans la partie "matériel et méthodes" sous la section "Photoactivation des triples hélices"), puis digéré par les deux enzymes de restriction MfeI et SpeI qui coupent le plasmide de part et d'autre de la région de formation des triples hélices. On libère ainsi un fragment d'acides nucléiques qui contient 70 paires
- 10 de bases après digestion du plasmide pXL2813 non modifié. Le fragment obtenu avec le plasmide et l'oligonucléotide formant une triple hélice lié covalamment à la double hélice compte 70 paires de bases plus 19 bases de l'oligonucléotide. Par migration sur un gel de polyacrylamide dénaturant, on peut ainsi séparer ces fragments de taille
- 15 différente: les fragments provenant de plasmides modifiés par une triple hélice ont une distance de migration plus courte que les fragments provenant de plasmides non modifiés. On peut donc, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant, quantifier la proportion de plasmides modifiés selon l'excès en molarité d'oligonucléotide par rapport au plasmide.

Les résultats sont indiqués à la Figure 5. Pour un excès en molarité d'oligonucléotide

- 20 par rapport au plasmide supérieur à 50, tous les plasmides sont modifiés et sont associés à un oligonucléotide Pso-GA₁₉-NLS. Sans photoactivation, on perd le retardement du fragment de digestion en gel dénaturant.

Il apparaît ainsi que les triples hélices formées avec les oligonucléotides Pso-GA₁₉-SH ou Pso-GA₁₉-NLS sont donc bien liées covalamment à la double hélice après

- 25 photoactivation.

Par ailleurs, en digérant le reste du squelette plasmidique et en l'analysant comme précédemment, on peut vérifier que la photoactivation n'entraîne pas de liaison covalente non spécifique de l'oligonucléotide Pso-GA₁₉-NLS en dehors de la région contenant la séquence susceptible de former une triple hélice.

Ces résultats mettent clairement en évidence les conditions permettant d'associer spécifiquement et covalamment une séquence peptidique à un plasmide, et ce en dehors du promoteur régulant l'expression du transgène, ce qui évite que l'expression du transgène n'en soit affectée.

5 **Exemple 3**

Cet exemple illustre la capacité du transgène à être exprimé bien que le plasmide soit modifié.

10 L'expression de la β -galactosidase par les plasmides pXL2813 non modifiés ou associés à un oligonucléotide Pso-GA₁₉-NLS a ainsi été comparée par transfection de cellules NIH3T3.

Les résultats sont reportés dans la figure 6, et les moyennes des valeurs obtenues (\pm écart type) sont rassemblées dans le tableau III suivant :

plasmide	expression du transgène (en RLU/ μ g de protéine)
pXL2813	253759 \pm 48545
pXL2813-Pso-TH-NLS	473984 \pm 111476
sans plasmide	129 \pm 85

Tableau III

15 On constate que l'expression du transgène augmente suite à la modification apportée par la fixation covalente d'une triple hélice en amont du promoteur.

20 Ces résultats mettent clairement en évidence que la formation des triples hélices n'affecte pas l'expression du transgène. Au contraire, grâce à l'adressage nucléaire du plasmide du fait de son couplage à la séquence de ciblage NLS, davantage de plasmides ont atteint le noyau, et il en résulte une augmentation de l'efficacité de transfection.

Exemple 4

Cet exemple illustre la caractérisation de la partie peptidique des conjugués Pso-GA₁₉-NLS.

La séquence peptidique utilisée, le signal NLS de l'antigène T de SV40, est reconnue
 5 par des récepteurs de la famille des karyophérines α . L'équivalent murin, appelé importine 60, fusionné à un groupement glutathion S-transferase, a été utilisé pour caractériser les conjugués oligonucléotide-peptide. Il a été opéré selon la méthode décrite dans la partie "Matériel et Méthodes" sous la section "Interactions avec les importines".

10 Les interactions entre des billes-glutathion recouvertes d'importines 60 et les oligonucléotides GA₁₉-NLS ou Pso-GA₁₉-NLS ont été étudiées. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, on sépare le culot de billes (contenant les éléments interagissant avec les importines) du surnageant

Le résultat de cette caractérisation est reporté à la figure 7. Cette figure indique que
 15 l'oligonucléotide Pso-GA₁₉-NLS est associé aux billes de glutathion, tandis que l'oligonucléotide Pso-GA₁₉ reste dans le surnageant.

Ceci montre clairement la capacité de l'oligonucléotide Pso-GA₁₉-NLS à interagir avec l'importine α . La partie peptidique des chimères oligonucléotide-peptide est donc bien reconnue par son récepteur, ce qui signifie que le peptide remplit
 20 effectivement son rôle de signal de ciblage.

Exemple 5

Cet exemple illustre la possibilité de coupler l'oligonucléotide GA₁₉-SH au peptide maléimide-NLS. Contrairement à l'exemple 1, la chimère n'est pas modifiée par un agent alkylant photoactivable.

25 L'oligonucléotide GA₁₉-SH, de séquence 5'-AAGGAGAGGAGGGAGGGAA-3' (SEQ ID N° 4), avec un groupement thiol à l'extrémité 5', a été couplé au peptide maléimide-NLS qui possède un groupement maléimide à son extrémité N-terminale dans les mêmes conditions que pour l'oligonucléotide Pso-GA₁₉-SH (voir exemple 1).

Le couplage est suivi par chromatographie liquide à haute pression (CLHP) en phase inverse. Il s'effectue avec une stoechiométrie équimolaire : en deux heures, le couplage est total. La chimère est ensuite purifiée par CLHP.

La chimère oligonucléotide-peptide a été analysée par action protéolytique de la trypsine comme décrit dans la partie "Matériel et méthodes".

Le résultat est représenté sur la Figure 8. Il est comparable à celui obtenu avec l'oligonucléotide Pso-GA₁₉-SH.

Exemple 6

Cet exemple illustre la possibilité de former des triples hélices entre le plasmide pXL2813 et la chimère GA₁₉-NLS en l'absence d'agent alkylant.

Une cinétique de formation de triples hélices entre le plasmide pXL2813 et la chimère GA₁₉-NLS obtenue comme décrit dans l'exemple 5, a été menée et étudiée selon la technique décrite dans la partie "Matériel et Méthodes", sous la section "Formation des triples hélices avec la chimère".

La figure 9 représente la cinétique de formation des triples hélices.

Il apparaît que dans les conditions de concentrations en plasmide de 40 nM et en oligonucléotide de 20 nM, on forme une triple hélice stable.

Exemple 7

Cet exemple illustre la caractérisation de la partie peptidique de la chimère GA₁₉-NLS.

La séquence peptidique utilisée, le signal NLS de l'antigène T de SV40, est reconnue par des récepteurs de la famille des karyophérines α , comme cela a déjà été mentionné à l'exemple 4. L'équivalent murin, appelé importine 60, fusionné à un groupement glutathion S-transferase, a été utilisé pour caractériser les conjugués oligonucléotide-peptide. Il a été opéré comme décrit dans "Matériel et Méthodes" sous la section "Interactions avec les importines".

Les interactions entre des billes-glutathion recouvertes d'importines 60 et les oligonucléotides GA₁₉ ou GA₁₉-NLS ont été étudiées. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, on sépare le culot de billes (contenant les éléments interagissant avec les importines) du surnageant.

- 5 Les résultats sont indiqués sur la Figure 10. Il apparaît que l'oligonucléotide GA₁₉-NLS est associé aux billes de glutathion, tandis que l'oligonucléotide GA₁₉ reste dans le surnageant.

Ceci montre clairement la capacité de l'oligonucléotide GA₁₉-NLS à interagir avec l'importine α . La partie peptidique des chimères oligonucléotide-peptide est donc
10 bien reconnue par son récepteur, et remplit là encore son rôle de signal de ciblage.

L'invention étant à présent complètement décrite, il est évident que de nombreuses modifications peuvent être apportées à la présente invention sans pour autant s'écarter de l'esprit de l'invention et de la portée des revendications qui suivent.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

- 5 (i) DEPOSANT:
(A) NOM: RHONE POULENC RORER
(B) RUE: 20 AVENUE RAYMOND ARON
(C) VILLE: ANTONY CEDEX
10 (E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 92165
(G) TELEPHONE: 01.55.71.73.26
(H) TELECOPIE: 01.55.71.72.91
- 15 (ii) TITRE DE L'INVENTION: VECTEURS DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES,
COMPOSITIONS LES CONTENANT, ET LEURS UTILISATIONS.
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES:13
- 20 (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:
(A) TYPE DE SUPPORT: Tape
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
25 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 25 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

40 GAGGCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTT
25

45 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
50 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

55

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

60 CTTCTTCTTC TTCTTCTTCTT
21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

AAGGGAGGGA GGAGAGGAA
19

20 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases
25 (B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

35 AAGGAGAGGA GGGAGGGAA
19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- 40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
45 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

TTGGTGTGGT GGGTGGGT
19

55

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- 60 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:
10 CTTCCCGAAG GGAGAAAGG
19

15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
20 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

25

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:
GAAGGGTTCT TCCCTCTTTC C
30 21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 13 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
40 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

45 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GAAAAAGGAA GAG
13

50

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 14 paires de bases
55 (B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
60

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

5 AAGAAAAAAA AGAA
14

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

10

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AAAAAAGGGA ATAAGGG
17

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 7 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

30

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

40

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

45 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 19 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

50

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

55

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
60 1 5 10 15

Leu Asp Lys

5 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 38 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 10 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

20 Asn Gln Ser Ser Asn Phe Gly Pro Met Lys Gly Gly Asn Phe Gly Gly
 1 5 10 15
 Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Tyr Phe Ala Lys Pro
 20 25 30
 25 Arg Asn Gln Gly Gly Tyr
 35

30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 7 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 35 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

Pro Lys Asn Lys Arg Lys Val
 1 5
 45

REVENDICATIONS

1. Vecteur de transfert d'acides nucléiques caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'ADN double brin et au moins un oligonucléotide couplé à un signal de ciblage et capable de former une triple hélice avec une séquence spécifique présente sur ladite molécule d'ADN double brin.
5
2. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 1 caractérisé en ce que la molécule d'ADN double brin est un plasmide ou un épisome.
3. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 2 caractérisé en ce que la molécule d'ADN double brin est un plasmide sous forme circulaire et dans un état superenroulé.
10
4. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon les revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la molécule d'ADN double brin comprend une cassette d'expression constituée d'un ou plusieurs gènes d'intérêt sous contrôle d'un ou plusieurs promoteurs et d'un terminateur transcriptionnel actif dans les cellules de mammifères.
15
5. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 4 caractérisé en ce que le gène d'intérêt est un acide nucléique codant pour un produit thérapeutique.
6. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double brin est une séquence homopurique-homopyrimidique.
- 20 7. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double brin est une séquence présente naturellement sur l'ADN double brin ou une séquence synthétique ou naturelle introduite artificiellement dans l'ADN double brin.

8. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'oligonucléotide comprend une séquence poly-CTT et la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double brin est une séquence poly-GAA.
- 5 9. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'oligonucléotide comprend la séquence GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTT (SEQ ID N° 1) ou bien la séquence (CTT)₇ (SEQ ID N° 2).
- 10 10. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double brin comprend la séquence 5'-AAGGGAGGGAGGAGAGGAA-3' (SEQ ID n°3) et l'oligonucléotide comprend la séquence 5'-AAGGAGAGGAGGGAGGGAA-3' (SEQ ID n°4) ou 5'-TTGGTGTGGTGGGTGGGT-3' (SEQ ID n°5).
- 15 11. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double brin comprend tout ou partie de la séquence 5'-CTTCCCGAAGGGAGAAAGG-3' (SEQ ID n°6) comprise dans l'origine de réplication ColE1 de E. coli, et l'oligonucléotide possède la séquence 5'-GAAGGGTTCTTCCCTCTTTCC-3' (SEQ ID n°7).
- 20 12. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double brin comprend la séquence 5'-GAAAAAGGAAGAG-3' (SEQ ID n°8) ou la séquence 5'-AAAAAAGGGAATAAGGG-3' (SEQ ID n°10) comprises dans le gène β -lactamase du plasmide pBR322.
- 25 13. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double

l'origine de réplication γ des plasmides à origine de réplication conditionnelle tel que pCOR.

14. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisé en ce que l'oligonucléotide comprend 5 à 30 paires de bases.

5 15. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 14 caractérisé en ce que l'oligonucléotide présente au moins une modification chimique le rendant résistant aux, ou protégé vis-à-vis des nucléases, ou augmentant son affinité vis-à-vis de la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double brin.

10 16. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 15 caractérisé en ce que l'oligonucléotide est un enchaînement de nucléosides ayant subi une modification du squelette.

17. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 15 caractérisé en ce que l'oligonucléotide est couplé à un agent alkylant formant une liaison covalente au niveau des bases de l'ADN double brin.

15 18. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 17 caractérisé en ce que ledit agent alkylant est photoactivable.

19. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon les revendications 17 et 18 caractérisé en ce que ledit agent alkylant est un psoralène.

20 20. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon les revendications 1 à 19 caractérisé en ce que le signal de ciblage interagit avec un composant de la matrice extracellulaire, un récepteur de la membrane plasmique, cible un compartiment intracellulaire, et/ou améliore le trafic intracellulaire de l'ADN double brin.

21. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 20 caractérisé en ce que ledit signal de ciblage comprend les facteurs de croissance (EGF, PDGF, TGF β ,

NGF, IGF I, FGF), les cytokines (IL-1, IL-2, TNF, Interferon, CSF), les hormones (insuline, hormone de croissance, prolactine, glucagon, hormone thyroïdienne, hormones stéroïdiennes), les sucres qui reconnaissent des lectines, les immunoglobulines, la transferrine, les lipoprotéines, les vitamines telles que la
5 vitamine B12, les hormones peptidiques ou les neuropeptides (tachykinines, neurotensine, VIP, endothéline, CGRP, CCK, ...), ou tout motif reconnu par les intégrines, par exemple le peptide RGD, ou par d'autres protéines extrinsèques de la membrane cellulaire.

22. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 20 caractérisé en ce
10 que le signal de ciblage est un signal de ciblage intracellulaire, tel qu'une séquence d'adressage nucléaire (NLS).

23. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 22 caractérisée en ce que le signal d'adressage nucléaire est la séquence NLS de l'antigène T de SV40.

24. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 20 caractérisée en
15 ce que le signal de ciblage permet à la fois le ciblage extracellulaire et le ciblage intracellulaire.

25. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon les revendications 1 à 24 caractérisé en ce que le couplage du signal de ciblage à l'oligonucléotide est obtenu par synthèse en phase solide ou en solution, notamment par l'établissement de liaisons disulfure,
20 thioéther, ester, amide, ou amine.

26. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins un vecteur tel que défini dans l'une des revendication 1 à 25.

27. Composition pharmaceutique selon la revendication 26 caractérisée en ce qu'elle contient en outre un ou plusieurs agents transfectant.

28. Composition pharmaceutique selon la revendication 27 caractérisée en ce que l'agent transfectant est un lipide cationique, une lipopolyamine, ou un polymère cationique.

29. Composition pharmaceutique selon les revendications 26 à 28 caractérisée en ce qu'elle contient en outre un ou plusieurs adjuvant(s) capable de s'associer aux complexes vecteur tel que défini dans l'une des revendications 1 à 24/agent transfectant.

30. Composition pharmaceutique selon la revendication 29 caractérisée en ce que l'adjuvant est un ou plusieurs lipides neutres choisis parmi les lipides synthétiques ou naturels, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques.

31. Composition pharmaceutique selon les revendications 29 et 30 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi les lipides à deux chaînes grasses.

32. Composition pharmaceutique selon les revendications 29 à 31 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi les dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléylpalmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), le di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamine ainsi que leurs dérivés N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérebrosides (tels que notamment les galactocérebrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines), et les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

33. Composition pharmaceutique selon la revendication 29 caractérisée en ce que l'adjuvant est ou comprend un composé intervenant au niveau de la condensation de l'ADN.

34. Composition pharmaceutique selon la revendication 33 caractérisée en ce que ledit composé dérive en tout ou en partie d'une histone, d'une nucléoline, et/ou d'une

protamine, ou est constitué en tout ou en partie de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA) répétés de manière continue ou non, le nombre de motifs pouvant varier entre 2 et 10.

5 35. Composition selon l'une quelconque des revendications 26 à 34 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.

36. Composition selon l'une quelconque des revendications 26 à 34 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou sur les muqueuses.

10 37. Utilisation d'un vecteur de transfert d'acides nucléiques tel que défini dans l'une des revendications 1 à 25 pour la transfection ciblée d'ADN dans les cellules.

38. Méthode de transfection d'acides nucléiques dans des cellules caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- 15 (1) synthèse de la chimère oligonucléotide - signal de ciblage,
(2) mise en contact de la chimère synthétisée en (1) avec un ADN double brin pour former des triples hélices,
(3) complexation du vecteur obtenu en (2) avec un ou plusieurs agent de transfection et/ou un ou plusieurs adjuvant(s), et
(4) mise en contact des cellules avec le complexe formé en (3).

20 39. Cellule recombinante contenant un vecteur tel que défini dans l'une des revendications 1 à 25.

40. Cellule recombinante selon la revendication 39 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule eucaryote.

ORIGINAL

8. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'oligonucléotide comprend une séquence poly-CTT et la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double brin est une séquence poly-GAA.
- 5 9. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'oligonucléotide comprend la séquence GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTT (SEQ ID N° 1) ou bien la séquence (CTT)₇ (SEQ ID N° 2).
- 10 10. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double brin comprend la séquence 5'-AAGGGAGGGAGGAGAGGAA-3' (SEQ ID n°3) et l'oligonucléotide comprend la séquence 5'-AAGGAGAGGAGGGAGGGAA-3' (SEQ ID n°4) ou 5'-TTGGTGTGGTGGGTGGGTT-3' (SEQ ID n°5).
- 15 11. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double brin comprend tout ou partie de la séquence 5'-CTTCCCGAAGGGAGAAAGG-3' (SEQ ID n°6) comprise dans l'origine de répllication ColE1 de E. coli, et l'oligonucléotide possède la séquence 5'-GAAGGGTTCTTCCCTCTTTCC-3' (SEQ ID n°7).
- 20 12. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double brin comprend la séquence 5'-GAAAAAGGAAGAG-3' (SEQ ID n°8) ou la séquence 5'-AAAAAAGGGAATAAGGG-3' (SEQ ID n°10) comprises dans le gène β -lactamase du plasmide pBR322 et de E. Coli respectivement.
- 25 13. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double brin comprend la séquence 5'-AAGAAAAAAAAGAA-3' (SEQ ID n°9) présente dans

l'origine de réplication γ des plasmides à origine de réplication conditionnelle tel que pCOR.

14. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisé en ce que l'oligonucléotide comprend 5 à 30 bases.
- 5 15. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 14 caractérisé en ce que l'oligonucléotide présente au moins une modification chimique le rendant résistant aux, ou protégé vis-à-vis des nucléases, ou augmentant son affinité vis-à-vis de la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN double brin.
- 10 16. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 15 caractérisé en ce que l'oligonucléotide est un enchaînement de nucléosides ayant subi une modification du squelette.
17. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 15 caractérisé en ce que l'oligonucléotide est couplé à un agent alkylant formant une liaison covalente au niveau des bases de l'ADN double brin.
- 15 18. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 17 caractérisé en ce que ledit agent alkylant est photoactivable.
19. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon les revendications 17 et 18 caractérisé en ce que ledit agent alkylant est un psoralène.
- 20 20. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon les revendications 1 à 19 caractérisé en ce que le signal de ciblage interagit avec un composant de la matrice extracellulaire, un récepteur de la membrane plasmique, cible un compartiment intracellulaire, et/ou améliore le trafic intracellulaire de l'ADN double brin.
21. Vecteur de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 20 caractérisé en ce que ledit signal de ciblage comprend les facteurs de croissance (EGF, PDGF, TGFb,

28. Composition pharmaceutique selon la revendication 27 caractérisée en ce que l'agent transfectant est un lipide cationique, une lipopolyamine, ou un polymère cationique.
29. Composition pharmaceutique selon les revendications 27 et 28 caractérisée en ce
5 qu'elle contient en outre un ou plusieurs adjuvant(s).
30. Composition pharmaceutique selon la revendication 29 caractérisée en ce que l'adjuvant est un ou plusieurs lipides neutres choisis parmi les lipides synthétiques ou naturels, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques.
- 10 31. Composition pharmaceutique selon les revendications 29 et 30 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi les lipides à deux chaînes grasses.
32. Composition pharmaceutique selon les revendications 29 à 31 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi les dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléylpalmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), le di-stéaroyl, -palmitoyl,
15 -mirystoyl phosphatidyléthanolamine ainsi que leurs dérivés N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérebrosides (tels que notamment les galactocérebrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines), et les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).
- 20 33. Composition pharmaceutique selon la revendication 29 caractérisée en ce que l'adjuvant est ou comprend un composé intervenant au niveau de la condensation de l'ADN.
34. Composition pharmaceutique selon la revendication 33 caractérisée en ce que ledit composé dérive en tout ou en partie d'une histone, d'une nucléoline, et/ou d'une

protamine, ou est constitué en tout ou en partie de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA) répétés de manière continue ou non, le nombre de motifs pouvant varier entre 2 et 10.

35. Composition selon l'une quelconque des revendications 26 à 34 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.

36. Composition selon l'une quelconque des revendications 26 à 34 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou sur les muqueuses.

37. Utilisation *in vitro* ou *ex vivo* d'un vecteur de transfert d'acides nucléiques tel que défini dans l'une des revendications 1 à 25 pour la transfection ciblée d'ADN dans les cellules.

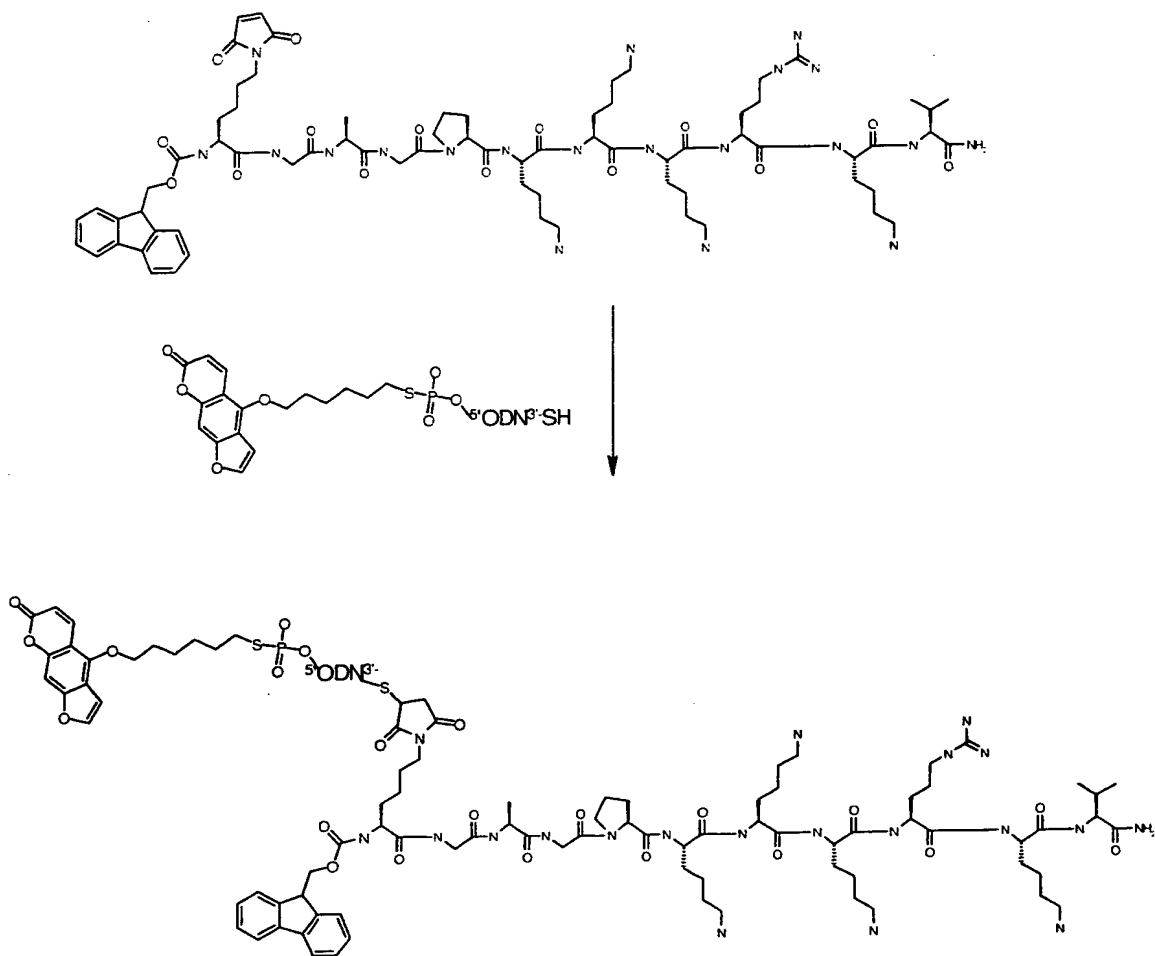
38. Méthode de transfection *in vitro* ou *ex vivo* d'acides nucléiques dans des cellules caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- (1) synthèse de la chimère oligonucléotide - signal de ciblage,
- (2) mise en contact de la chimère synthétisée en (1) avec un ADN double brin pour former des triples hélices,
- (3) complexation du vecteur obtenu en (2) avec un ou plusieurs agent de transfection et/ou un ou plusieurs adjuvant(s), et
- (4) mise en contact des cellules avec le complexe formé en (3).

39. Cellule recombinante contenant un vecteur tel que défini dans l'une des revendications 1 à 25.

40. Cellule recombinante selon la revendication 39 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule eucaryote.

Figure 1/10



ORIGINAL

Figure 2/10

1

2

3

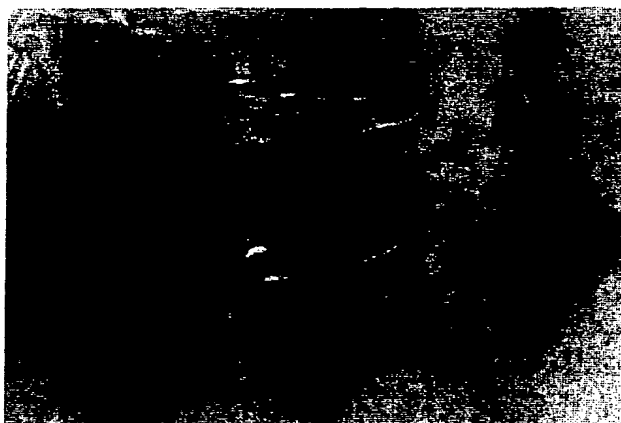
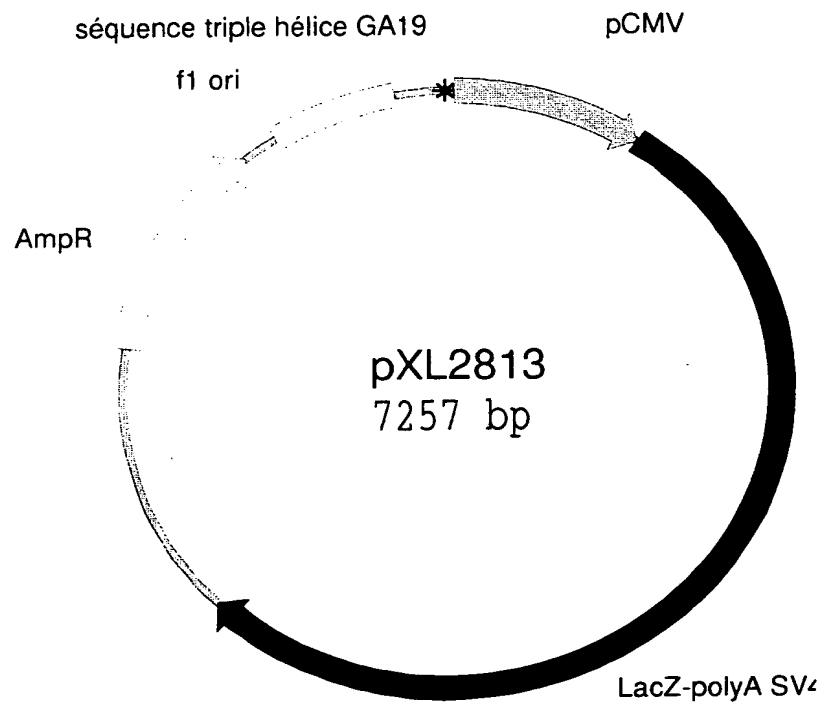
**ORIGINAL**

Figure 3/10



ORIGINAL

Figure 4/10

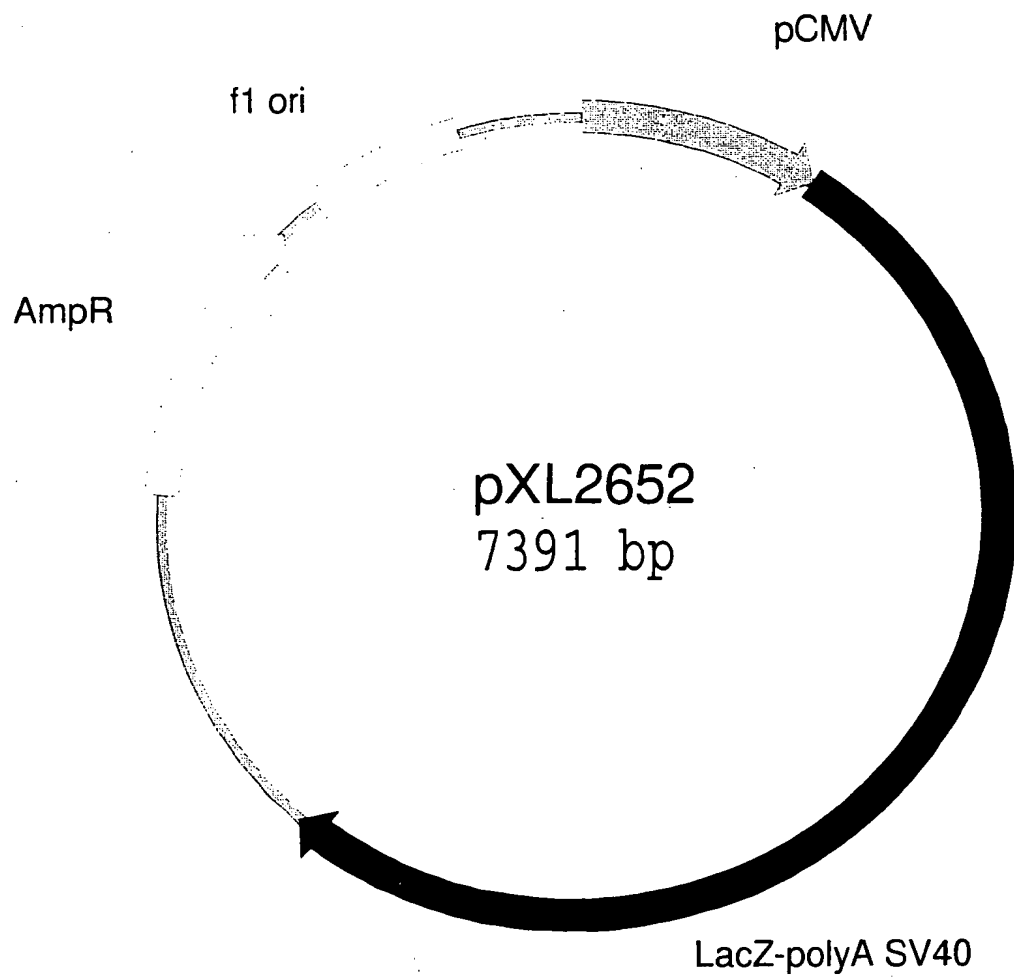


Figure 5/10

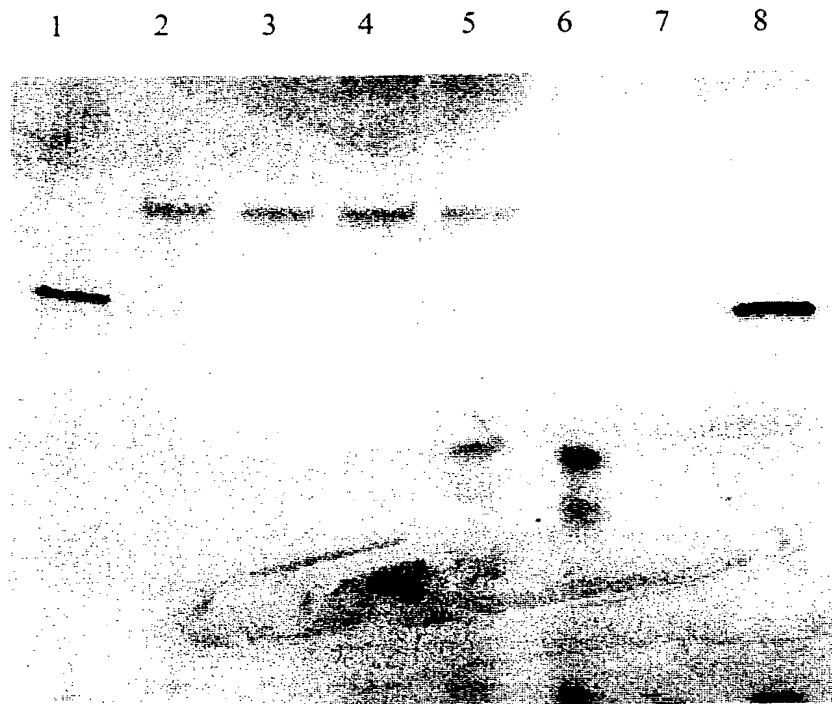
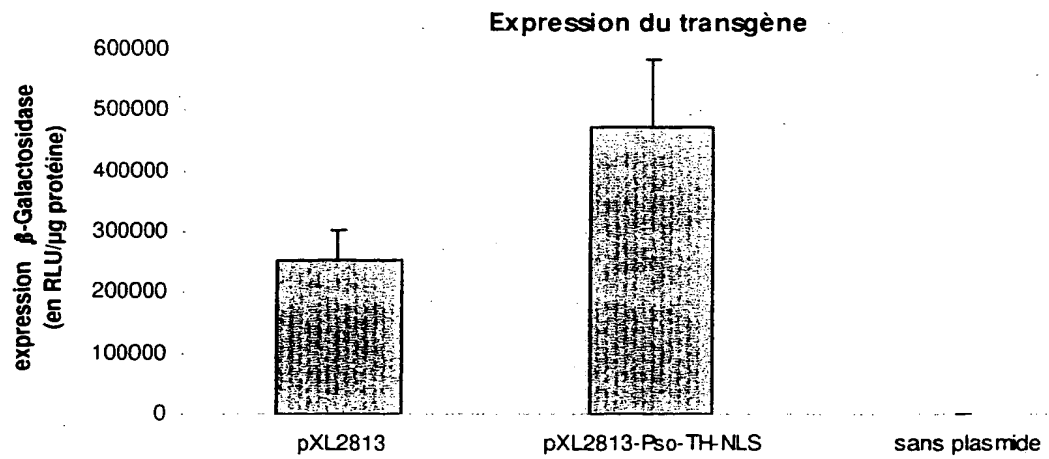
**ORIGINAL**

Figure 6/10



ORIGINAL

Figure 7/10

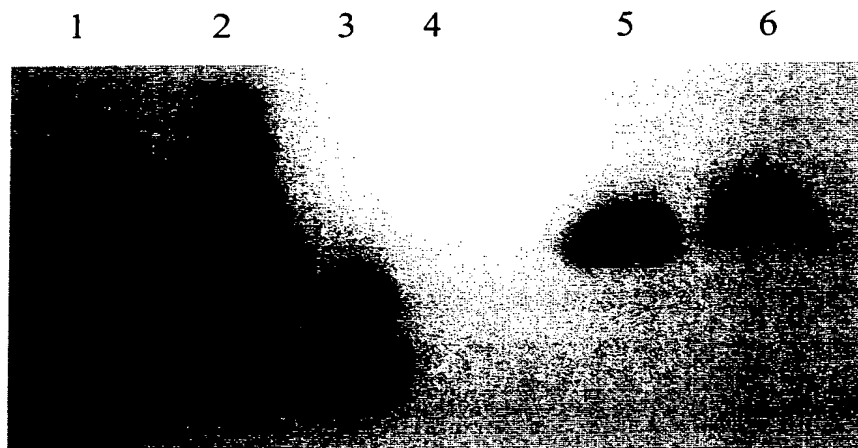
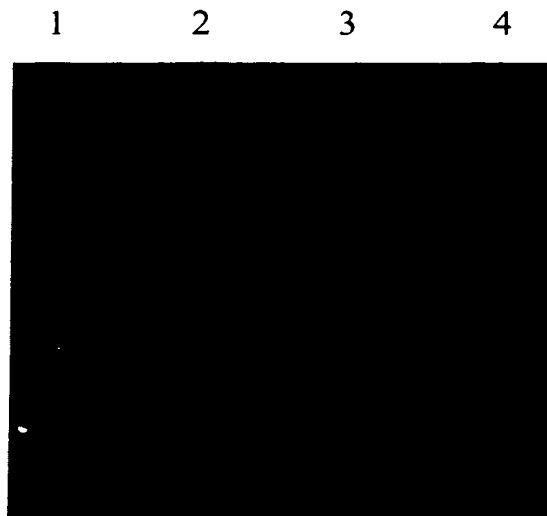
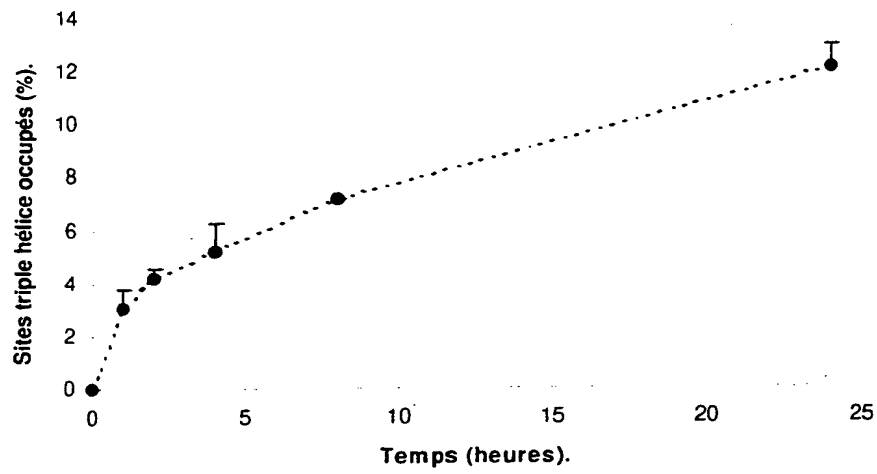
**ORIGINAL**

Figure 8/10



ORIGINAL

Figure 9/10



11/11/2011

Figure 10/10

1 2 3 4 5 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)